

Efeito biológico dos taninos condensados sobre a quantificação de protozoários ruminais em bovinos de corte

Roberta Cavalcante Cracco¹, Gisele Maria Fagundes², Gabriela Benetel³, Flávia Alves Melo⁴, Katiéli Caroline Welter⁵, Kelly Cristina dos Santos⁶, Tatiane Ninomya Ribeiro⁷, Ives Claudio da Silva Bueno⁸

1 - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/Universidade de São Paulo.

2 - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/Universidade de São Paulo.

3 - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/Universidade de São Paulo.

4 - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/Universidade de São Paulo.

5 - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/Universidade de São Paulo.

6 - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/Universidade de São Paulo.

7 - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/Universidade de São Paulo.

8 - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/Universidade de São Paulo.

RESUMO - O estudo teve o objetivo de avaliar o efeito in vitro de 10 plantas taniníferas sobre a quantificação de protozoários na microbiota de bovinos de corte. A avaliação da bioatividade dos taninos foi obtida através de técnica de bioensaio in vitro. Os inóculos foram obtidos de quatro animais Nelore adultos fistulados. O delineamento experimental utilizado foi em blocos aleatorizados em arranjo fatorial, sendo 24 tratamentos: 12 forrageiras (dez leguminosas e 2 controles) com e sem polietilenoglicol, com 4 repetições (blocos) e duas réplicas dentro de cada bloco. Os parâmetros avaliados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e o teste de média utilizado foi Duncan ao nível de 5% de probabilidade. Os resultados mostraram que os taninos condensados (TC) interferem na quantidade de protozoários no rúmen de bovinos.

Palavras-chave: Flavonóides, Leguminosas, Microbiota ruminal, Técnicas moleculares

Biological effect of condensed tannins on the quantification of ruminal protozoa in beef cattle

ABSTRACT - The aim of the study was to evaluate the in vitro effect of tannin from 10 plant species on the quantification of protozoa in the beef cattle microbiota. Four adult rumen-cannulated Nelore cattle grazing a tropical grass pasture with free access to a mineral premix and fresh water were used as inoculum donors. A bioassay based on the in vitro gas production technique was used to estimate the biological activity of tannins. The experimental design included an entirely randomized blocks with factorial arrangement. The data were subjected to analysis of variance followed by Duncan test to determine the significance of the difference between treatment means. The results showed that condensed tannins (CT) affect protozoa number in bovine rumen.

Keywords: Flavonoids, Legumes, Ruminal Microbiota, Molecular techniques

Introdução

O metano produzido durante a fermentação anaeróbia no rúmen não só afeta a eficiência da utilização de energia pelos ruminantes, como também contribui com o efeito estufa para o meio ambiente. Como 90% de nossos bovinos são criados em sistemas extensivos com baixos índices zootécnicos, a nossa pecuária, possui um grande impacto sobre o meio ambiente, e optar por estratégias nutricionais naturais capazes de reduzir a metanogênese ruminal pode atenuar o impacto ambiental. Algumas espécies de leguminosas que podem ser consumidas por ruminantes são ricas em compostos fenólicos, como os taninos. Alguns estudos têm demonstrado que os taninos condensados (TC) podem alterar a população de protozoários do rúmen (Martinele et al., 2010; Patra & Saxena, 2011; Bodas et al., 2012, Bhatta et al., 2013). A importância de se reduzir a população de protozoários nos ruminantes, se deve ao fato de os mesmos possuem simbiose com arqueias metanogênicas. Segundo Williams & Coleman, (1997), os protozoários podem contribuir com até 37% da formação de CH₄ no rúmen, pois o hidrogênio produzido por estes microrganismos é utilizado na formação de metano pelas arqueias. Dentro desse contexto, o estudo teve o objetivo de avaliar o efeito in vitro de 10 plantas taniníferas sobre a quantificação de protozoários da microbiota de bovinos de corte.

Revisão Bibliográfica

Vários estudos têm demonstrado que leguminosas temperadas (*Hedysarium coronarium*, *Lespedeza cuneata*, *Lotus corniculatus* e *L. uliginosus*) e leguminosas tropicais (*Calliandra calothyrsus*, *Flemingia macrophylla*), fontes de compostos secundários como os taninos condensados (TC) quando utilizadas em concentrações moderadas como estratégia nutricional, podem alterar benéficamente a microbiota ruminal (Lascano & Cárdenas, 2010; Patra & Saxena, 2011).

Os taninos condensados (TC) são substâncias formadas pela polimerização de unidades de flavonoides, geralmente flavan-3-óis e/ou flavan-3,4-dióis. Esses taninos também são denominados de proantocianidinas (Patra & Saxena, 2011), pois podem ser hidrolisados por ácidos fortes a antocianidinas. Tais polímeros, de elevado peso molecular, são resultado de mecanismos desenvolvidos ao longo da escala do processo evolutivo pelas plantas, como forma de defesa contra a herbivoria (Muir, 2011). Estes componentes têm sido mostrados como capazes de exercer atividades antihelmíntica, antimicrobiana e antioxidante em ruminantes, afetando positivamente o bem-estar animal e a qualidade dos produtos oriundos destes (Patra & Saxena, 2011; Luciano et al., 2011; Fagundes et al., 2014).

Materiais e Métodos

O experimento foi desenvolvido no laboratório de Fermentabilidade Ruminal do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, localizado no município de Pirassununga, São Paulo. Foram utilizadas dez leguminosas exóticas ricas em TC, sendo *Flemingia macrophylla*, *Leucaena leucocephala*, *Stylosanthes guianensis*, *Gliricidia sepium*, *Cratylia argentea*, *Cajanus cajan*, *Desmodium ovalifolium* e *Macrotiloma axillare* de ambiente tropical e *Desmodium paniculatum* e *Lespedeza procumbens* de ambiente temperado. A bioatividade das leguminosas sobre a microbiota de bovinos foi obtida através de bioensaio in vitro (Theodorou et al., 1994; Mauricio et al., 1999). Como doadores de inóculo ruminal foram utilizados quatro bovinos Nelore fistulados, mantidos a pasto com livre acesso a água e sal mineral. Em cada garrafa de vidro de 160 mL foram adicionados em duplicata, 0,5 g de cada planta (tratamento) seca e moída a 1 mm juntamente com 25 mL de inóculo e 50 mL de solução nutritiva. Após 24 h de incubação, amostras do líquido ruminal contido em cada garrafa foram coletadas para a realização das análises de PCR em tempo real (qPCR) segundo protocolo descrito por Sylvester et al., 2004. O delineamento experimental utilizado foi em blocos aleatorizados em arranjo fatorial, sendo 24 tratamentos: 12 forrageiras (dez leguminosas e 2 controles) com e sem PEG, com 4 repetições (blocos) e duas réplicas dentro de cada bloco. Para extração de DNA foi utilizado o Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega®). A concentração do DNA obtida de cada amostra foi quantificada utilizando espectrofotômetro. Após a extração e dosagem da concentração de DNA das amostras do rúmen, estes foram submetidos a técnica de qPCR utilizando os respectivos primers: 316f: 5`GCTTTCGWTGGTAGTGTATT 3` e 539R: 5`CTTGCCCTCYAATCGTWCT 3`. Os parâmetros avaliados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e o teste de média utilizado foi Duncan ao nível de 5% de probabilidade. Os procedimentos estatísticos

foram obtidos com auxílio do programa SAS 9.2.

Resultados e Discussão

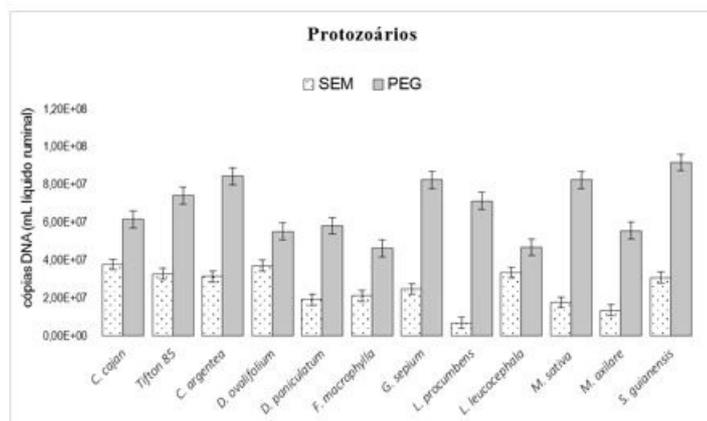
Para as quantificações de protozoários, a presença de PEG confirmou que as espécies *C. argentea* e *L. procumbens* mostraram efeito deletério sobre esses microrganismos. Por sua vez, na espécie controle alfafa, também foi observado valores elevados de protozoários comparada com a fermentação para esta mesma espécie sem PEG. No grupo sem PEG observou-se um menor número de protozoários para todas as espécies de leguminosas avaliadas.

Em concordância aos resultados observados, Bhatta et al. (2013) verificaram que das 21 plantas taniníferas estudadas, 12 espécies reduziram a população de Entodinia e 7 espécies a população de Holotricha. Martinele et al. (2010), ao estudarem o efeito de algumas espécies de plantas nativas do cerrado, também verificaram uma redução no número de protozoários ciliados, principalmente na população de Entodinia. No entanto, apesar das constantes inibições relatadas em determinados estudos, ainda hoje não se conhece o exato efeito deletério dos taninos sobre a população de protozoários no rúmen.

Conclusões

A população de protozoários foi menor em todos os tratamentos avaliados em comparação ao grupo com a incubação contendo polietilenoglicol. Isso confirma o efeito dos taninos condensados sobre esses microrganismos. Os taninos condensados das espécies *C. argentea* e *L. procumbens* resultam em uma diminuição na população de protozoários. Desse modo, os taninos condensados podem ser utilizados como modeladores naturais do rúmen, sendo um recurso para a substituição da monensina.

Gráficos e Tabelas



(<http://cdn5.abz.org.br/wp->

Figura 1. Efeito dos TC das plantas avaliadas sobre a quantificação de protozoários na microbiota de bovinos de corte após 24 h de incubação.

content/uploads/2016/12/Capturar-resumo-1.jpg)

Referências

BHATTA, R.; BARUAH, L.; SARAVANAN, M.; SURESH, K. P.; SAMPATH, K. T. Effect of medicinal and aromatic plants on rumen fermentation, protozoa population and methanogenesis in vitro. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, v.97, p.446-456, 2013. BODAS, R.; PRIETO, N.; GARCÍA-GONZÁLEZ, R.; ANDRÉS, S.; GIRÁLDEZ, F. J.; López, S. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology*, v.176, p.78-93,

2012. FAGUNDES, G. M.; MODESTO, E. C.; FONSECA, C. E. M.; LIMA, H. R. P.; MUIR, J.P. Intake, digestibility and milk yield in goats fed *Flemingia macrophylla* with or without polyethylene glycol. *Small Ruminant Research*, v.116, p.88-93, 2014. LASCANO, C. E.; CÁRDENAS, E. Alternatives for methane emission mitigation in livestock systems. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.39 (supl. especial), p.175-182, 2010. MAURICIO, R.M.; MOULD, F.L.; DHANOA, M.S.; OWEN, E.; CHANNA, K.S.; THEODOROU, M.K. A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Animal Feed Science and Technology*, v. 79, p. 321-330, 1999. MARTINELE, I.; SANTOS, G.R.A.; MATOS, D.S.; A, BATISTA, A.M.V.B.; D'AGOSTO, M. Diet botanical composition and rumen protozoa of sheep in brazilian semi-arid area. *Archivos de Zootecnia*, v.59, p.169-175, 2010. MUIR, J. P. The multi-faceted role of condensed tannins in the goat ecosystem. *Small Ruminant Research*, v. 98, p.115-120, 2011. PATRA, A. K.; SAXENA, J. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.91, p.24-37, 2011. SYLVESTER J.T.; KARNATI S.K.; Yu Z, MORRISON, M.; FIRKINS, J.L. Development of an assay to quantify rumen ciliate protozoal biomass in cows using real-time PCR. *The Journal of Nutrition*, v. 134, p.3378-3384, 2004. THEODOROU, M.K.; WILLIAMS, B.A.; DHANOA, M.S.; MCALLAN, A.B.; FRANCE, J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, v. 48, p. 185-197, 1994. WILLIAMS, A. G.; COLEMAN, G. S. The rumen protozoa. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. *The rumen microbial ecosystem*. London: Blackie Academic & Professional, 1997. p.73-139.